

NOUVEAUX COMPOSES AROMATIQUES INHIBITEURS DES
ALDOLASES, PROCEDE DE SYNTHESE ET APPLICATIONS

L'invention concerne de nouveaux composés inhibiteurs de
5 la glycolyse, dont l'action se manifeste par une inhibition des aldolases.
L'invention concerne aussi leur procédé de synthèse et leurs applications
-notamment dans la fabrication de médicaments pour le traitement du cancer.

La glycolyse représente un mécanisme complexe qui fait
intervenir une cascade de dix enzymes différentes pour assurer la dégradation
10 anaérobie du glucose avec libération d'énergie emmagasinée sous forme d'ATP
(adénosine-5'-triphosphate).

Parmi les dix enzymes prenant part à la glycolyse, les
aldolases (fructose-1,6-bisphosphate aldolases), enzymes homotétramériques,
interviennent dans une étape importante : le clivage du fructose-1,6-bisphosphate
15 (Fru(1,6) P_2) en deux trioses phosphates, le dihydroxyacétone phosphate (DHAP)
et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP). Le clivage du Fru(1,6) P_2 par les
aldolases s'effectue selon un mécanisme multi-étapes définissant une pluralité
d'intermédiaires réactionnels bien identifiés.

Les aldolases sont essentielles dans la voie de la glycolyse,
20 et par conséquent précieuses pour la synthèse du pyruvate et de l'ATP.

Les aldolases se répartissent selon deux classes (Ruther et
al., 1964, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 23:1248-1257). Les aldolases
d'une classe se distinguent de celles de l'autre classe notamment par leurs
origines, mais aussi par leur mode de fonctionnement. Les aldolases de classe I,
25 présentes dans l'espèce animale, les plantes supérieures et certains parasites,
fixent le Fru(1,6) P_2 en formant une imine protonée (ou base de Schiff) entre un
résidu de lysine (lys-229) du site actif et le substrat. Les aldolases de classe II,
quant à elles, sont spécifiques des organismes procaryotes. Elles nécessitent la
présence, au niveau de leur site catalytique, d'un ion métallique bivalent pour
30 fixer et stabiliser le substrat sous forme énolate, avant clivage.

Parmi les inhibiteurs des aldolases de classe I connus à ce jour, on peut citer des inhibiteurs compétitifs, notamment ceux décrits dans Blonski C. et *al.*, 1997 (Biochem. J., 323:71-77) : des dérivés phosphatés de l'hydroquinone (HQN- P_2), du résorcinol (RSN- P_2) et le benzaldéhyde-4-phosphate (HBA- P). Testés sur l'aldolase de muscle de lapin, ces inhibiteurs présentent, respectivement une constante de dissociation (ou constante d'inhibition) K_i de l'ordre de 135, 40 et 500 μ M. On connaît aussi des composés phosphatés de constante d'inhibition K_i de l'ordre de 30-40 μ M (Hartman et *al.*, 1965, Biochemistry, 4:1068-1075).

10 On peut aussi citer le 2-hydroxybenzaldéhyde-4-phosphate (Blonski C. et *al.*, 1997, Biochem. J., 323:71-77) un inhibiteur réversible dépendant du temps de constante d'inhibition globale K_i^* de 35 ± 5 μ M, capable de réduire 80 % de l'activité des aldolases pour une concentration d'inhibiteur de l'ordre de 200 μ M.

15 A l'instar de ces composés, les autres inhibiteurs des aldolases connus à ce jour (Gefflaut T. et *al.*, 1995, Prog. Biophys. Mol. Biol., 63(3):301-340), et les inhibiteurs de la glycolyse en général, présentent une activité inhibitrice faible, à moins de les utiliser à très forte concentration, ce qui limite considérablement leur champ d'application. Aussi, leur application à faible
20 concentration, par exemple à des concentrations compatibles avec des doses thérapeutiques, est difficilement envisageable.

Or, dans bien des applications, et en particulier dans le domaine médical, une inhibition significative de la glycolyse est recherchée et ce pour des concentrations d'inhibiteur suffisamment faibles pour éviter tout effet
25 nocif pour le patient. A ce titre, on connaît une approche, désignée par approche GRH ("Glycerol rescued hypoxia"), imaginée pour le traitement de certains cancers et de certaines tumeurs solides (Mc Carty M.F., 2001, Med. Hypotheses, 56:286-289). Son fondement repose en particulier sur deux constats.

En premier lieu, il a été montré que les tumeurs solides et
30 les cancers létaux qui se développent dans des tissus où règne une faible concentration en oxygène (conditions d'hypoxie), possèdent un phénotype

faisant intervenir la glycolyse comme voie unique de production d'énergie. Il a été également montré que les cellules de ce type se caractérisent aussi par une absence d'activité de la glycérol kinase, une enzyme particulière qui permet aux cellules saines d'utiliser le glycérol en remplacement du glucose.

5 L'approche GRH propose donc d'inhiber la voie de la glycolyse dans toutes les cellules du patient tout en lui dispensant une dose suffisante de glycérol en guise de source unique d'énergie. Les cellules cancéreuses dont la glycolyse représente la voie primordiale de synthèse d'ATP se trouvent ainsi "affamées" ne pouvant utiliser ni le glucose, ni le glycérol
10 comme source d'énergie alternative au glucose. Les cellules saines, quant à elles, grâce à l'activité glycérol-kinase et d'autres enzymes de la partie inférieure de la glycolyse (celle des trioses) peuvent utiliser le glycérol pour la synthèse du pyruvate. On affame donc les cellules cancéreuses tout en assurant aux tissus sains un apport énergétique convenable.

15 Cependant, à ce jour, encore aucun traitement anti-cancéreux empruntant l'approche GRH n'a pu être mis en oeuvre en raison de l'absence d'inhibiteurs suffisamment efficaces de la glycolyse, et plus particulièrement d'inhibiteurs d'une des enzymes de la partie supérieure de la glycolyse (celle des hexoses).

20 De même, la glycolyse représentant la seule voie de synthèse énergétique pour de nombreux parasites, le blocage de la glycolyse peut être également une approche très prometteuse pour le traitement de nombreuses pathologies d'origine parasitaire.

Il existe ainsi actuellement une réelle nécessité de pouvoir
25 disposer d'au moins un inhibiteur efficace de la glycolyse, notamment dans la perspective de surmonter le cancer ainsi que certaines maladies parasitaires, ou dans le cadre d'éradiquer tout organisme pour lequel la glycolyse représente une voie de synthèse d'énergie principale, voire essentielle.

La présente invention vise à pallier les lacunes
30 précédemment signalées en proposant de nouveaux composés chimiques ayant la capacité d'inhiber la glycolyse et en particulier l'activité des aldolases de classe I.

L'invention vise plus particulièrement à proposer des composés qui par leur efficacité d'inhibition des aldolases peuvent être utilisés à titre de médicaments, c'est-à-dire efficacement et ceci à des doses thérapeutiques -notamment dans le cadre de traitements du cancer-.

5 L'invention a également pour objectif de proposer des applications de ces composés à titre d'agents inhibiteurs de la glycolyse, à l'exception des applications thérapeutiques. Par extension, l'invention tend à proposer de nouveaux médicaments, notamment pour le traitement du cancer et/ou des maladies parasitaires. -

10 Enfin, l'invention a pour objectif de proposer un procédé de synthèse des composés selon l'invention, de mise en oeuvre à la fois simple, quantitative et peu coûteuse, en d'autres termes, un procédé compatible avec les contraintes économiques d'une production à l'échelle industrielle.

Dans tout le texte, on adopte la terminologie suivante :

15 - maillon aromatique : cycle conjugué d'un noyau aromatique dans lequel les électrons libres peuvent se déplacer d'un atome de carbone à un autre sans se lier à aucun d'eux (délocalisation des électrons par effet de résonance), et d'un atome de carbone d'un maillon à un atome de carbone d'un autre maillon ; les noyaux aromatiques de type naphthalène mis en oeuvre
20 dans l'invention présentent ainsi une alternance de liaisons simples (liaisons σ) et doubles (liaisons π), conduisant à un système d'électrons π fortement délocalisés entre les deux maillons aromatiques formant ces noyaux,

- mimétique du groupement phosphate : substituant d'un composé chimique, autre qu'un groupement phosphate, adapté pour améliorer la
25 biodisponibilité du composé chimique au niveau de sa cible protéique (l'aldolase) dans le cadre de l'invention ; les mimétiques du groupement phosphate peuvent être de deux types : des groupements protecteurs enzymolabiles ou des analogues stables du phosphate,

- groupement protecteur enzymolabile : mimétique du
30 groupement phosphate adapté pour permettre la diffusion passive du composé à travers des systèmes membranaires cellulaires ou parasitaires, selon une méthode

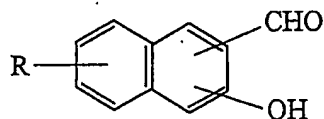
de masquage de charges puis pour subir, à l'intérieur de la cellule ou du parasite, une transformation (ou déprotection) enzymatique de façon à pouvoir générer un groupement phosphate ou un analogue stable du phosphate,

- analogue stable du phosphate : mimétique du groupement phosphate qui par comparaison à un groupement phosphate présente une stabilité améliorée vis-à-vis des conditions physiologiques -notamment pH et/ou environnement enzymatique-.

L'invention concerne un composé aromatique comprenant un groupement aldéhyde, un groupement phénol et un groupement phosphate ou un mimétique du groupement phosphate, tel qu'un groupement protecteur enzymolabile ou un analogue stable du phosphate, caractérisé :

- en ce que son noyau aromatique est formé par la condensation de deux maillons aromatiques de type benzénique,
- et en ce qu'il répond à la formule générale suivante :

15



(I)

20 dans laquelle :

- le groupement aldéhyde (-CHO) et le groupement phénol (-OH) sont fixés à deux atomes de carbone adjacents d'un même maillon aromatique, dit premier maillon aromatique,
- et, fixé à un atome de carbone d'un deuxième maillon aromatique, dit second maillon aromatique, R est un groupement phosphate ou un mimétique du groupement phosphate.

25

Bien que les mécanismes réels de l'inhibition des aldolases de classe I ne soient pas définitivement élucidés spécifiquement pour chacun des composés de l'invention, les travaux des inventeurs sur certains de ceux-ci ainsi que les travaux de modélisation du site actif de différentes aldolases de classe I, permettent d'envisager une inhibition efficace de ces aldolases grâce à des composés qui répondent à la définition précédente.

30

L'invention a ainsi permis de montrer que la présence simultanée d'un groupement phosphate, d'un groupement hydroxyle et d'un groupement aldéhyde, greffés à une structure chimique de géométrie plane telle qu'un noyau aromatique de type naphthalène, est nécessaire pour générer une
5 bonne reconnaissance et une affinité appréciable avec le site actif des aldolases.

Le groupement phosphate est essentiel à la reconnaissance de l'inhibiteur par l'aldolase. Le groupement phosphate s'insère à l'intérieur de la poche de reconnaissance de l'enzyme et permet au composé aromatique d'adopter une bonne orientation à l'intérieur du site actif. Le composé
10 aromatique expose alors les groupements aldéhyde et phénol à bonne distance d'au moins un des trois résidus de lysine (Lys-107, Lys-146, Lys-229) du site actif, de façon à former avec celui-ci, à pH physiologique, une liaison stable de type imine protonée ou base de Schiff. L'exigence de la disposition du groupement phosphate sur un maillon aromatique autre que celui occupé par
15 l'aldéhyde et l'hydroxyle, a ainsi une grande importance. En effet, un noyau aromatique de type naphthalène permet de positionner l'hydroxyle et l'aldéhyde à une distance du groupement phosphate particulièrement appropriée pour une bonne affinité du composé vis-à-vis des aldolases ; la distance séparant le groupement phosphate de l'aldéhyde et de l'hydroxyle conduit à une
20 reconnaissance du groupement phosphate par les aldolases et à la stabilisation du composé dans le site actif, par le biais d'un des trois résidus de lysine, avec une très faible contrainte exercée sur le composé et donc une faible dépense d'énergie.

D'autre part, les positions respectives de l'aldéhyde et de
25 l'hydroxyle par rapport au phosphate jouent un rôle important dans la sélectivité d'une aldolase particulière pour un composé bien défini selon l'invention.

Enfin, la présence des groupements hydroxyle et aldéhyde sur deux atomes de carbone adjacents d'un même maillon aromatique est primordiale et gouverne la formation de cette liaison particulière au niveau du
30 site actif des aldolases de classe I. Le groupement hydroxyle joue vraisemblablement un rôle de catalyseur acide lors de la déshydratation de la

carbinolamine intermédiaire et intervient ensuite vraisemblablement dans la stabilisation de la base de Schiff protonée, générant ainsi une inhibition efficace quasi-irréversible, voire irréversible.

Un noyau aromatique de type naphtalène sur lequel sont greffés les groupements phosphate, aldéhyde et phénol à des positions particulières, permet également et avantageusement de définir un composé à géométrie plane conformationnellement plus contrainte que les substrats des aldolases (Fru(1,6) P_2 , GAP, DHAP), et de dimensions adaptées, respectant à la fois les contraintes d'accessibilité du composé au site actif des aldolases, et d'encombrement stérique à ce niveau.

De tels composés aromatiques sont donc susceptibles d'occuper le site actif des aldolases de classe I de sorte que la fixation et le clivage du Fructose-1,6-bisphosphate puissent être empêchés, et *in fine*, de façon à entraîner le blocage de la glycolyse. De tels composés aromatiques sont ainsi susceptibles d'inhiber de façon efficace les aldolases de cellules eucaryotes et/ou de parasites, et donc de bloquer la glycolyse des cellules eucaryotes et/ou parasitaires.

Cependant, lorsqu'une inhibition intracellulaire et/ou intraparasitaire est souhaitée, l'état d'ionisation du groupement phosphate, nécessaire à la reconnaissance et à l'encrage d'un composé selon l'invention au site actif des aldolases, engendre un problème pour le passage de ces inhibiteurs à travers la membrane cellulaire, se traduisant par une mauvaise biodisponibilité de ces composés d'où une faible activité globale.

Une première approche permettant d'améliorer la biodisponibilité d'un composé phosphate, consiste à protéger les groupements phosphates de façon à masquer temporairement ces charges -notamment au moyen de groupements protecteurs enzymolabiles-, et ainsi permettre leur passage de façon passive à travers des membranes cellulaires.

Par ailleurs, le pH, notamment dans les tissus vivants, cellules et parasites, peut être à l'origine d'un clivage spontané du groupement phosphate. De même, de nombreuses enzymes -notamment les phosphatases-

sont capables de cliver la liaison cycle aromatique-phosphate. Aussi, pour les applications sur des tissus, cellules, parasites vivants, il est préférable de substituer ces groupements phosphates par des mimétiques, notamment des analogues stables du phosphate.

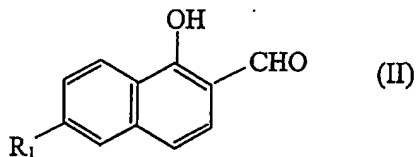
5 Avantageusement, un mimétique du groupement phosphate est choisi parmi :

- un groupement protecteur enzymolabile adapté pour permettre audit composé aromatique un passage passif à travers des systèmes membranaires cellulaires et/ou parasitaires et pour pouvoir générer, une fois à l'intérieur
- 10 d'une cellule ou d'un parasite, la formation d'un groupement phosphate ou d'un analogue stable du groupement phosphate,
- un analogue stable du phosphate adapté pour préserver le composé aromatique d'une déphosphorylation spontanée et/ou enzymatique -notamment par les phosphatases cellulaires et/ou parasitaires-.

15 A titre d'exemples non limitatifs de composés selon l'invention susceptibles d'inhiber les aldolases, on peut citer des composés qui, selon la nomenclature officielle, peuvent être désignés par : le 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate, le 6-formyl-5-hydroxy-2-naphtylphosphate, le 4-formyl-5-hydroxy-1-naphtylphosphate, le 5-formyl-4-hydroxy-1-naphtyl-

20 phosphate, le 4-formyl-3-hydroxy-2-naphtylphosphate, le 3-formyl-4-hydroxy-2-naphtylphosphate, le 3-formyl-2-hydroxy-1-naphtylphosphate, le 2-formyl-3-hydroxy-1-naphtylphosphate, ou un dérivé de ces derniers obtenu par la substitution du groupement phosphate par un mimétique du groupement phosphate selon l'invention.

25 Avantageusement, un composé aromatique selon l'invention a pour formule générale :



30 où R₁ est un groupement phosphate ou un mimétique du groupement phosphate.

Lorsque R_1 est un groupement phosphate, le composé aromatique selon la formule générale (II) est alors désigné, conformément à la nomenclature officielle, par le 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate (désigné par la suite par FHN-*P*). Aussi, un composé selon l'invention et de formule générale (II) peut être le 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate ou un dérivé de ce dernier, obtenu par une substitution du groupement phosphate par un mimétique selon l'invention.

Des études d'interaction du FHN-*P* avec les aldolases de classe I, plus particulièrement avec l'aldolase de muscle de lapin, ont été réalisées par spectroscopie UV/visible de différence et par spectrométrie de masse électrospray. Ces études ont été complétées à la fois par des analyses de cinétiques enzymatiques et des expériences utilisant des aldolases mutées.

Sur l'aldolase de muscle de lapin, l'invention a permis de mettre en évidence la formation d'une base de Schiff entre le groupement aldéhyde du composé aromatique selon l'invention et l'enzyme. Elles ont également permis de montrer l'implication du résidu Lys-107 dans la formation de cette base de Schiff. Enfin, l'inhibition de l'aldolase de muscle de lapin par le FHN-*P* a été définie comme étant une inhibition réversible dépendante du temps ("slow-binding inhibition"). Ce type d'inhibition, outre le fait de présenter un haut degré de sélectivité, se caractérise par une fixation lente de l'inhibiteur à l'enzyme qui peut être aussi efficace qu'une inhibition réalisée par un inhibiteur de type irréversible chimiquement réactif (Morrison et Walsch, 1988, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 61:201-301). L'inhibition de l'aldolase de muscle de lapin par le FHN-*P* se caractérise par une constante globale d'inhibition K_i^* de l'ordre de 25 nM. Ainsi, ce composé représente à ce jour l'inhibiteur réversible dépendant du temps le plus puissant vis-à-vis des aldolases de classe I. Qui plus est, comme toute inhibition impliquant la formation d'une base de Schiff entre inhibiteur et un résidu de lysine, cette inhibition peut être rendue irréversible par un traitement au borohydride de sodium du complexe inhibiteur-enzyme.

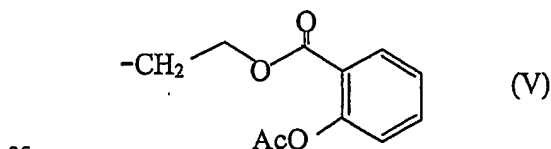
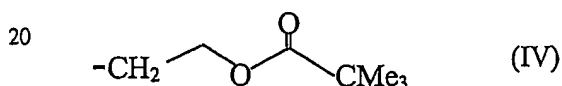
Il est à noter qu'un composé tel que le 2-(4-formyl-3-hydroxyphényl)-1-éthylène dihydrogène phosphate peut être considéré dans l'inhibition des aldolases comme un équivalent de FHN-*P*. En effet, ce composé répond, de façon très comparable au FHN-*P*, aux conditions nécessaires à l'inhibition des aldolases, précédemment exposées. La présence du groupement phosphate de ce composé permet tout d'abord une reconnaissance par les aldolases. Ce composé tout comme le FHN-*P* s'oriente alors à l'intérieur du site actif et, compte tenu de la distance séparant le groupement phosphate des groupements aldéhyde et phénol, très sensiblement identique à celle des groupements de FHN-*P*, il expose au proche voisinage d'un des résidus de lysine ses groupements aldéhyde et phénol.

Avantageusement, un groupement protecteur enzymolabile selon l'invention est un groupement de nature à être déprotégé par une(des) estérase(s) intracellulaire(s).

Avantageusement, et selon l'invention ce groupement protecteur enzymolabile présente la formule générale suivante :

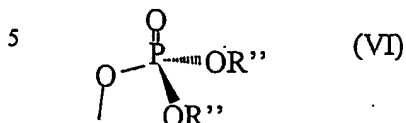


où R' peut être choisi parmi un des groupements suivants :

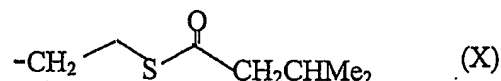
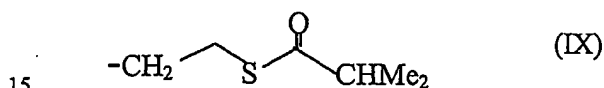
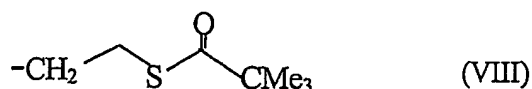
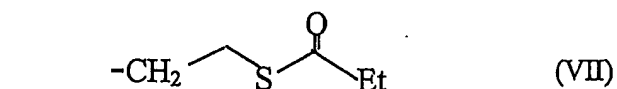


Un composé aromatique selon l'invention présente ainsi un groupement protecteur enzymolabile, dit de type oxyméthylester. Les mécanismes de déprotection d'un tel groupement enzymolabile sont notamment décrits par Farquhar et *al.*, 1983 (J. Pharm. Sci., 72:324-325), et par Srivastva et *al.*, 1984 (Bioorg. Chem., 12:118-124).

Avantageusement, selon une autre variante, un groupement protecteur enzymolabile selon l'invention, de nature à être déprotégé par des estérases intracellulaires, présente la formule générale suivante :



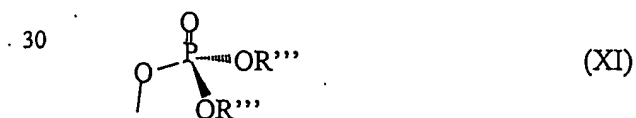
où R'' peut être choisi parmi un des groupements suivants :



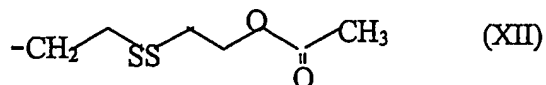
Bien que les groupements protecteurs enzymolabiles de type thioester font intervenir pour leur déprotection les mêmes enzymes que pour les groupements protecteurs enzymolabiles de type oxyméthylester, le mécanisme réactionnel est cependant bien différent et est notamment décrit par Lefebvre et *al.*, 1995 (J. Med. Chem., 38:3941-3950).

Selon une variante de réalisation en matière de masquage temporaire de charge, un groupement protecteur enzymolabile selon l'invention est susceptible d'être déprotégé par une(des) réductase(s) intracellulaire(s).

Avantageusement, selon cette variante de réalisation, un groupement protecteur enzymolabile répond à la formule générale suivante :



où R''' peut être choisi parmi un des groupements suivants :



5 Les mécanismes de déprotection d'un tel groupement protecteur enzymolabile ont été décrits par Puech et *al.*, 1993 (Antiviral Res., 22:155-174).

Il est bien entendu possible de pallier l'état ionisé du groupement phosphate de certains composés aromatiques selon l'invention par
10 des techniques autres que le masquage de charges par des groupements protecteurs enzymolabiles. Selon l'application envisagée (sur des aldolases extraites ou non de cellules), on pourra préférer avoir recours à un encapsulage particulier (forme gallénique), ou à une technique d'administration particulière (méthodes d'injections), en complément ou en remplacement des groupements
15 protecteurs enzymolabiles, et notamment ceux précédemment cités.

Avantageusement, un analogue stable du phosphate selon l'invention peut être choisi parmi l'un des groupements suivants :

- le méthylènegphosphonate,
- le difluorométhylènegphosphonate,
- 20 - le monofluorométhylènegphosphonate,

notamment décrits dans Nieschalk J. et *al.*, 1996 (Tetrahedron Lett., 52(1):165-176).

Avantageusement et selon l'invention, un atome d'hydrogène d'au moins un des atomes de carbone d'au moins un des maillons
25 aromatiques est substitué par un substituant, dit substituant hydrophobe adapté pour améliorer l'hydrophobicité globale du composé. La présence d'un tel groupement facilite l'accès d'un composé aromatique selon l'invention au site actif, relativement hydrophobe, des aldolases. Il convient en outre de choisir un groupement compatible avec la synthèse du composé selon l'invention et de tenir
30 compte des contraintes d'encombrement stérique au niveau du site actif des aldolases.

Avantageusement, chacun des substituants hydrophobes selon l'invention est un groupement alkyle de chaîne principale comprenant au maximum trois atomes de carbone.

L'invention concerne en outre un composé aromatique
5 selon l'invention pour ses utilisations comme agent inhibiteur de l'activité des aldolases de classe I, et par extrapolation, comme agent inhibiteur de la glycolyse, chez les organismes eucaryotes. Avantageusement, l'utilisation d'un composé aromatique se fait dans un cadre non thérapeutique.

Avantageusement et selon l'invention, un composé
10 aromatique utilisé à cette fin est susceptible de présenter une constante d'inhibition K_i des aldolases inférieure à 25 μM , notamment inférieure à 50 nM -typiquement de l'ordre de 25 nM-.

Avantageusement et selon l'invention, un composé
aromatique utilisé à cette fin est susceptible d'inhiber au moins une aldolase de
15 façon irréversible ou quasi irréversible.

L'invention s'étend à un procédé d'inhibition d'aldolases
extracellulaires ou intracellulaires, avantageusement à l'exception des aldolases
intracellulaires de cellules vivantes non isolées d'un corps humain ou d'un corps
animal ou d'un embryon humain, dans lequel on met ces aldolases au contact d'au
20 moins un composé aromatique selon l'invention, au moins en quantité suffisante
pour induire un effet notable sur l'activité des aldolases.

Avantageusement, un procédé selon l'invention est
appliqué à l'inhibition de la glycolyse cellulaire.

Avantageusement, un procédé selon l'invention peut être
25 appliqué pour enrayer le développement d'une cellule cancéreuse.

L'invention s'étend aussi à un médicament comprenant un
composé aromatique selon l'invention.

Dans la lutte contre le cancer, différentes approches
thérapeutiques ont été imaginées (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie,...) et
30 de nombreux traitements sont aujourd'hui utilisés. Toutefois, à ce jour, il n'existe
aucun traitement totalement efficace contre les cancers. Le choix des traitements

actuels se fait généralement en fonction du type de tissu et des organes atteints, ainsi que du degré de diffusion et de la malignité. Cependant, beaucoup de traitements sont mal supportés à plus ou moins long terme par les patients. De ce fait, une approche multi-thérapeutique est généralement prescrite, d'où la
5 nécessité de pouvoir disposer de différents traitements pour pouvoir soigner un même type de cancer et qu'il sera possible de prescrire alternativement à un patient. La possibilité de pouvoir mettre en oeuvre l'approche GRH donnerait lieu à de nouveaux traitements et ainsi un grand progrès dans la lutte contre le cancer. Un composé aromatique selon l'invention permet de mettre en oeuvre très
10 favorablement l'approche GRH.

L'invention s'étend ainsi également à l'utilisation d'un composé aromatique selon l'invention pour la fabrication d'un médicament pour le traitement du cancer -notamment pour la fabrication d'un médicament pour le traitement du cancer s'effectuant selon l'approche GRH-.

15 L'invention s'étend aussi à un procédé de synthèse d'un composé aromatique selon l'invention.

Selon un premier aspect de l'invention, le procédé permet la synthèse d'un 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde phosphorylé sur un atome de carbone du deuxième maillon aromatique.

20 Avantageusement, un procédé de synthèse selon l'invention comprend une étape de phosphorylation d'un composé 2-naphtaldéhyde dihydroxylé, hydroxylé sur l'atome de carbone 1 du premier maillon aromatique et sur un des atomes de carbone du second maillon aromatique, ladite phosphorylation correspondant à une substitution du groupement hydroxyle du
25 second maillon aromatique par un groupement phosphate.

Avantageusement et selon l'invention, l'étape de phosphorylation est initiée par la technique du triéthyl phosphite, pyridine et iode, dans une solution de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (Stowel J.K. et *al.*, 1995, Tetrahedron Lett., 36:182-185 ; Ladame S. et *al.*, 2001, Phosphorus, Sulfur and Silicon,
30 174:37-47).

Avantageusement et selon l'invention, la phosphorylation est effectuée sur le 1,6-dihydroxy-2-naphtaldéhyde pour aboutir, après déprotection (Page P. et *al.*, 1999, Bioor. Med. Chem., 7:1403-1412), au 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate (FHN-P).

5 L'invention concerne aussi un composé aromatique inhibiteur d'aldolase, un procédé d'inhibition des aldolases et de la glycolyse, ainsi qu'un médicament, caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques mentionnées ci-dessus ou ci-après.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention
10 apparaissent à la lecture des exemples qui suivent. Les figures 1 à 5 illustrent les résultats obtenus dans ces exemples.

Méthodes de synthèse et d'analyse physico-chimique

Toutes les réactions sensibles à l'humidité ont été réalisées sous atmosphère d'argon dans des conditions anhydres.

15 Le tétrahydrofurane (THF) et l'éther éthylique sont distillés sur sodium/benzophénone. Le dichlorométhane est distillé sur P₂O₅. La pyridine et la triéthylamine sont distillées sur de la potasse. Le méthanol est distillé en présence d'une quantité faible de sodium. Les solvants pour les chromatographies liquides à haute pression (HPLC) sont utilisés sans autres purifications.

20 L'évolution des réactions a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice (Merck 60-F254) en utilisant des systèmes d'éluants appropriés. Les produits ont été révélés par irradiation UV ($\lambda=254$ nm et 366 nm) ou par utilisation de vapeur d'iode ou de révélateur spécifique comme le zinzade (molybdate d'ammonium) pour les produits
25 phosphorylés, ou le révélateur de Pancaldi contenant 5% de sulfate de cérium (IV), une solution aqueuse d'acide sulfurique à 6% et 8% de molybdate d'ammonium.

Les produits ont été purifiés par chromatographie flash sur gel de silice (Merck-60, 230-400 mesh) ou bien par chromatographie liquide à
30 haute pression (HPLC) préparative sur colonne phase inverse C18 (Macherey-Nagel polygoprep C18, 12-25 μ m, 60A) avec des systèmes d'éluants appropriés.

Les spectres RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker AC 200 ou AC 250. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, à partir du tétraméthylsilane pour les noyaux ^1H et ^{13}C , à partir de l'acide phosphorique pour le noyau ^{31}P . Les valeurs des constantes de couplages sont exprimées en Hz. Les abréviations suivantes ont été utilisées : s, singulet ; se singulet élargi ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet et m, multiplet.

Les spectres de masse (DCI) sont réalisés sur un spectromètre quadripolaire Nermag R10-10.

Les analyses élémentaires ont été effectuées sur un appareil Eager 200.

EXEMPLE 1 : Synthèse du 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate (FHN-P) :

Le 1,6-dihydroxy-2-naphtaldéhyde (0,21 g ; 1,1 mmol), préalablement synthétisé (Jonhson W.S.J. et Shelberg W.E., 1945, J. Am. Chem. Soc., 67:1745-1753 ; Jonhson W.S.J. et *al.*, 1944, J. Am. Chem. Soc., 66:218-222 ; Bilger C. et *al.*, 1987, Eur. J. Med. Chem., 22:363-365), est mis en solution dans du CH_2Cl_2 (34 ml). On ajoute de la pyridine anhydre (0,1 ml ; 1,24 mmol) maintenue à 0°C. On ajoute alors un mélange de iode (0,1 g ; 1,2 mmol) et de triéthyle phosphite (0,23 ml ; 1,32 mmol) dissous dans du CH_2Cl_2 (10 ml). L'ensemble est maintenu sous agitation à 0°C pendant 1 heure puis laissé à température ambiante. De l'eau (20 ml) est ajoutée. La phase organique est lavée avec de la saumure (solution d'eau saturée en NaCl) puis séchée sur du MgSO_4 . On supprime le solvant à pression réduite. Après chromatographie flash (CH_2Cl_2), une huile de couleur jaune est obtenue (0,11 g ; 31%) : le 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde-6-diéthylphosphate.

Du bromotriméthylsilane (0,15 ml ; 1,1 mmol) est ajouté lentement sous agitation à la solution de 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde-6-diéthylphosphate (0,054 g ; 0,17 mmol) précédemment obtenue, en solution dans du CH_2Cl_2 anhydre (200 μl) sous atmosphère d'azote. Le mélange obtenu est agité pendant 3 heures à température ambiante. Du $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (10:1) est alors ajouté et la phase organique obtenue est lavée à l'eau. Le pH de la phase aqueuse

est ajusté à 7,6 avec de la soude 1 M. La solution est lyophilisée pour aboutir à une poudre blanche (0,050 g ; 96%) de 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate (FHN-P) sous forme de sel de sodium.

¹H NMR (250 MHz, D₂O) : δ7,11 (d, ³J_{H3-H4}=8,50 Hz, 1H, H3) ; 7,34 (d, ³J_{H7-H8}=8,00 Hz, 1H, H7) ; 7,41 (se, 1H, H5) ; 8,24 (d, ³J_{H4-H3}=8,50 Hz, 1H, H4) ; 9,84 (d, ³J_{H8-H7}=8,00 Hz, 1H, H8) ; 9,91 (s, 1H, CHO).

¹³C NMR (50 MHz, D₂O) : δ114,73 (C2) ; 116,93 (C10) ; 118,32 (d, ³J_{C-P}=3,57 Hz, C5) ; 120,13 (C8) ; 123,36 (d, ³J_{C-P}=5,00 Hz, C7) ; 123,42 (C9) ; 126,72 (C3) ; 128,31 (C4) ; 142,35 (C1) ; 158,49 (d, ²J_{C-P}=6,00 Hz, C6) ; 198,32 (CHO).

³¹P NMR (81 MHz, D₂O) : δ0,56.

Spectrométrie de masse (FAB) : 267, λ_{max} ^H₂O (pH 7,6) : 392 nm (ε5100 M⁻¹·cm⁻¹), 277 nm (ε4650 M⁻¹·cm⁻¹).

EXEMPLE 2 : Activité inhibitrice de l'aldolase de muscle de lapin (RM) par FHN-P

• Méthode d'analyse :

L'activité aldolase a été mesurée au moyen d'un système de tests enzymatiques couplés : le système triose-phosphate isomérase et glycérol-3-phosphate déshydrogénase (TIM/GDH) en suivant l'oxydation du NADH (Boehringer-Mannheim, France), à 340 nm, au moyen d'un spectrophotomètre SAFAS thermostaté à 25°C. Les tests ont été initiés par addition du substrat (le Fru (1,6)P₂ ; 1 mM en concentration finale), pour compléter une solution d'aldolase réalisée dans un tampon triéthanolamine (tampon TEA) (100 mM TEA/HCl ; 50 mM NaCl ; 1 mM EDTA, pH 7,6 ; de force ionique 0,15), 0,42 mM de NADH, et contenant les deux systèmes enzymatiques (10 µg/ml de GDH et 1 µg/ml de TIM) pour un volume final de 1 ml. La construction, la surexpression et la purification de l'aldolase recombinante ont été réalisées selon Morris A.J. et *al.*, 1993, (J. Biol. Chem., 265:1095-1100) et Berthiaume L. et *al.*, 1993 (J. Biol. Chem., 268:10826-10835).

Le taux de clivage du substrat est déterminé en mesurant la décroissance de l'absorbance/minute à 340 nm. L'aldolase est dialysée toute la nuit à 4°C contre un tampon TEA avant utilisation. La concentration en protéine

est déterminée par spectrophotométrie en utilisant comme coefficient d'extinction $\epsilon_{280}=0,91 \text{ ml.mg}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. La concentration de sous-unités est déterminée en se basant sur un poids moléculaire de 159 000 pour un tétramère d'aldolase.

- Méthode cinétique :

5 Dans le cas présent, l'inhibition réversible dépendante du temps ("Slow binding inhibition") implique la formation rapide d'un équilibre entre l'enzyme E et l'inhibiteur I, suivie d'un complexe initial EI qui subit une isomérisation lente et réversible vers un complexe EI* cinétiquement plus stable, comme montré dans le schéma réactionnel et dans les équations réactionnelles
10 présentés à la Figure 1, où K_i^* représente la constante globale d'inhibition, K_i la constante de dissociation du complexe de Michaelis EI, rapidement formé, et K_d la constante de dissociation du complexe EI*.

- Caractérisation de l'inhibition réversible dépendante du temps :

En absence du substrat la constante de vitesse apparente
15 d'ordre 1 (k_{app}) décrivant la formation du complexe EI* est définie par l'équation eqn.(1) (Figure 1) (Morrison et Walsh, 1988, Adv. Enzymol. Relat. Aeras Mol. Biol, 61:201-300).

La valeur de k_{app} reflète la cinétique de saturation lorsque la concentration d'inhibiteur [I] croît, elle varie entre des limites basse et haute,
20 respectivement, de k_2 et k_2+k_{-2} .

A l'équilibre, lorsque $[EI^*]>[EI]$, on utilise l'équation eqn.(2) (Figure 1), où $[E]_i$ et $[I]_i$ représentent les concentrations initiales, respectivement, de l'enzyme et de l'inhibiteur ; et K_d est la constante de dissociation du complexe EI* (Segal I.H., 1975, Enzyme kinetics : Behavior and
25 Analysis of Steady-State and Rapid Equilibrium Enzyme Systems, Willey-Interscience, New-York).

Dans la situation extrême où k_{-2} tend vers zéro, un inhibiteur réversible dépendant du temps peut s'apparenter à un inhibiteur irréversible dirigé contre le site actif. Dans cette situation, l'équation eqn.(3) est
30 utilisée pour ce type d'inhibition (Meloche H.P., 1967, Biochemistry, 6:2273-2280). Le temps de demi-inactivation de l'enzyme ($t_{1/2}$) se définit comme étant

une fonction de la concentration de l'inhibiteur réciproque et est représentée graphiquement par une droite coupant l'axe des ordonnées en $\ln(2/k_2)$ et coupant l'axe des abscisses en $-1/K_i$.

- Protocole expérimental :

5 L'aldolase native (5 μM de sous-unités) est incubée en présence de FHN-*P* (0,05-1 mM) dans le tampon TEA. L'activité enzymatique est analysée en fonction du temps avec des aliquots de 10 μl .

La cinétique d'inactivation suit une cinétique de pseudo premier ordre et les paramètres cinétiques K_i et k_2 sont déterminés en utilisant
10 l'équation eqn.(3). Pour déterminer le taux de réactivation, l'aldolase (25 μM de sous-unités dans le tampon TEA) est incubée avec 500 μM de FHN-*P* jusqu'à obtenir 90% d'inactivation. L'excès d'inhibiteur est enlevé par ultrafiltration en utilisant une membrane (Millipore) PM-30. Le complexe enzyme-inhibiteur est incubé dans le tampon TEA (15 μM de sous-unités en concentration finale)
15 contenant l'hexitol-*P*₂ (10 mM). Des aliquots (10 μl) sont prélevés à différents temps pour mesurer l'activité aldolase.

Les contrôles consistent à répéter le protocole sans FHN-*P*. Le processus de réactivation est analysé comme si c'était une réaction d'ordre 1.
- Suivi par spectroscopie UV/visible de différence.

20 Les spectres d'absorption sont mesurés en utilisant un spectrophotomètre Cary 1E Varian thermostaté à 25°C. Le même tampon TEA est utilisé pour les titrations et les analyses d'activité. Les spectres d'absorption sont mesurés par deux méthodes différentes, notamment décrites dans Gefflaut T. et *al.*, 1986 (Bioorg. Med. Chem., 4:2043-2054) et Blonski C. et *al.*, 1997
25 (Biochem. J., 323:71-77).

Pour la méthode A, les spectres d'absorption sont enregistrés en fonction temps, soit entre 250 et 500 nm, soit à des longueurs d'onde correspondant à l'absorption maximale ou minimale. Les mesures sont initiées par addition de FHN-*P* à différentes concentrations finales (0,1-1 mM)
30 dans le tampon TEA renfermant une concentration fixe d'aldolase (10 μM de sous-unités). Les spectres d'absorption mesurés du complexe enzymatique sont

corrigés avec l'absorbance du tampon, de FHN-*P*, et de l'enzyme (mesurées séparément). Les spectres d'absorption de différence ainsi obtenus sont utilisés pour déterminer la valeur des constantes définissant la formation du complexe aldolase-inhibiteur.

5 La méthode B est utilisée pour le titration du FHN-*P* par l'acide aminocaproïque. Pour chaque analyse au tampon TEA renfermant une concentration fixe de FHN-*P* (10 μ M), l'acide aminocaproïque est ajouté pour obtenir différentes concentrations finales (0,01-0,2 M). Les spectres d'absorption de différence, correspondant à la formation d'une base de Schiff, sont enregistrés
10 à différents intervalles de temps, puis corrigés avec l'absorbance du tampon, de l'acide aminocaproïque, et de FHN-*P* (mesurées séparément).

La constante de vitesse apparente d'ordre 1 (k_{app}) et les variations d'absorption maximales limites (ΔA_{max}) sont obtenues pour chaque test en appliquant les données d'absorption dépendantes du temps à l'équation
15 cinétique d'ordre 1 (ou à l'ensemble des deux mécanismes cinétiques d'ordre 1). La constante de dissociation (K_d) de la base de Schiff formée entre le FHN-*P* et l'acide aminocaproïque est obtenue à partir des différences d'absorption déterminées à l'équilibre en utilisant l'équation eqn.(2). La valeur de la constante de dissociation (K_i) du complexe EI rapidement formé et celle de la constante k_2
20 correspondant à la formation lente du complexe EI* proviennent de l'analyse des valeurs des constantes d'ordre 1 selon les équations eqn.(1) ou eqn.(3).

Tous les tests de spectroscopie UV/visible de différence utilisant des aldolases mutants (10 μ M de sous-unités) sont menés en utilisant la méthode A.

25 - Suivi par spectrométrie de masse électrospray (ESI/MS)

Les spectres de masse électrospray sont obtenus en mode positif sur un quadripôle Finnigan Mat TSQ 700. Les aldolases (50 μ M de sous-unités dans le tampon TEA) sont incubées avec 50 μ M de FHN-*P* jusqu'à atteindre 60 \pm 5 % d'inactivation. L'excès d'inhibiteur est supprimé par
30 ultrafiltration au tampon acétate d'ammonium (10 mM, pH 5,5). Les échantillons sont préparés à environ 10 pmol/ μ l dans H₂O/méthanol (1:1, v/v) avec une

concentration finale de 1 mM d'acétate d'ammonium et 0,5% d'acide acétique. Les échantillons sont infusés à l'intérieur de la source du spectromètre avec un débit continu de 4 μ l/min.

- Résultats

- 5 - Inhibition réversible dépendant du temps de l'aldolase par FHN-P.

L'incubation de l'aldolase de muscle de lapin avec le FHN-P conduit à une perte de l'activité enzymatique selon une cinétique d'ordre 1.

- 10 Le substrat Fru(1,6) P_2 et le substrat analogue l'hexitol- P_2 , un puissant inhibiteur compétitif des aldolases, montrent une protection de l'enzyme contre l'inactivation par le FHN-P (Tableau 1), correspondant à une inhibition se produisant au niveau du site actif de l'enzyme.

- 15 Les conditions expérimentales et les mesures effectuées, reprises dans le tableau 1 ci-après, sont les suivantes : l'aldolase native (RM) de muscle de lapin (0,2 mg/ml) est incubée en présence d'une concentration fixe de FHN-P (250 μ M) dans le tampon TEA (volume final de 1 ml ; pH 7,6) avec ou sans Fru(1,6) P_2 ou hexitol- P_2 (1 mM) ; l'activité enzymatique des aliquotes est analysée après 80 minutes d'incubation.

- 20 Par comparaison, dans les mêmes conditions expérimentales (décrites dans le Tableau 1), l'analogue non-phosphorylé du FHN-P (1,6-dihydroxy-2-naphtaldéhyde ou DHNA, à 250 μ M) est totalement inactif suggérant fortement l'implication fonctionnelle du groupement phosphate dans la fixation de FHN-P au site actif de l'enzyme. Les paramètres cinétiques
25 dérivent des constantes apparentes d'ordre 1 (k_{app}) mesurées pour différentes concentrations d'inhibiteur (0,01-1,5 mM) selon l'équation eqn.(3) et sont repris dans le Tableau 2.

Tableau 1

Conditions	Activité spécifique (Unité/mg)
RM seul	12,5±0,5
RM + FHN- <i>P</i>	2,8±0,3
RM + FHN- <i>P</i> + Fru(1,6) <i>P</i> ₂	5,2±0,4
RM + FHN- <i>P</i> + hexitol- <i>P</i> ₂	9,9±0,5
RM + DHNA	12,5±0,5

Tableau 2

Paramètres	Valeur
$K_i(\mu\text{M})$	250±100
$k_2(\text{min}^{-1})$	0,07±0,01
$k_2(\text{min}^{-1})$	13±7.10 ⁻⁶
$K_i^*(\text{nM})$	40±20

5

L'activité enzymatique est récupérée pour partie en incubant les enzymes inactivées dans une solution dépourvue de FHN-*P* et contenant une concentration saturante en hexitol-*P*₂ (10 mM). La valeur de la constante d'ordre 1 ($k_2=1,3\pm 7,10^{-5}\text{min}^{-1}$) reflétant le recouvrement de l'activité enzymatique est d'environ quatre ordres inférieurs à la constante d'inactivation k_2 .

FHN-*P* se comporte donc comme un inhibiteur réversible dépendant du temps. D'après les valeurs exposées dans le Tableau 2, la constante globale de dissociation K_i^* peut être estimée à 40±20 nM. Par ailleurs, l'activité enzymatique ne peut être restaurée après un traitement du complexe enzyme-inhibiteur par le borohydride de sodium, ce qui suggère que le mécanisme d'inhibition par FHN-*P* engendre la formation d'une base de Schiff avec un résidu de lysine du site actif.

- Interaction du FHN-*P* avec l'acide aminocaproïque

Le FHN-*P* et le groupe ε-amino des résidus de lysine de l'aldolase ont été pris comme modèle pour la formation de la base de Schiff ; là

20

réaction de FHN-*P* (10 μ M) avec l'acide aminocaproïque (0,1-1 mM) comme référence, et a été suivie par spectroscopie UV/visible de différence. La réaction modèle, représentée à la Figure 3 (partie supérieure), se caractérise par des changements d'absorbance en UV/visible de différence correspondant à deux maxima à 425 nm ($\Delta\epsilon$ 3730 \pm 200 M⁻¹.cm⁻¹) et à 291 nm ($\Delta\epsilon$ 13080 \pm 700 M⁻¹.cm⁻¹), ce qui peut être attribué à la formation d'une base de Schiff. Cette réaction modèle se caractérise également par deux minima à 367 nm ($\Delta\epsilon$ -740 \pm 50 M⁻¹.cm⁻¹) et à 267 nm ($\Delta\epsilon$ -5650 \pm 300 M⁻¹.cm⁻¹) résultant de la perte de FHN-*P* à l'intérieur du complexe covalent. La présence des points isosbestiques à 388, 343 et 276 nm indique que les intermédiaires ne s'accumulent pas et qu'il n'y a pas non plus de réaction secondaire. Les changements d'absorbance différentielle à l'équilibre deviennent saturants lorsqu'on augmente les concentrations en acide aminocaproïque (Figure 2) et la cinétique de réaction pour chacune de ces concentrations s'apparente à celle d'un mécanisme réactionnel de pseudo premier ordre et correspond à une constante d'ordre 2, k_{2nd} , de 0,12 \pm 0,01 M⁻¹.min⁻¹ à 25°C. La valeur de la constante de dissociation, K_d , du complexe FHN-*P*-acide aminocaproïque est de 16 \pm 3 mM (Figure 2).

- Interaction entre FHN-*P* et l'aldolase de muscle de lapin

Lorsque le FHN-*P* (0,1-1 mM, de concentration finale) est ajouté à une solution contenant l'aldolase native (10 μ M de sous-unités), le spectre UV/visible de différence résultant présente des maxima à 431 et 293 nm, des minima à 376 et 268 nm, et des points isosbestiques à 401 et 279 nm (Figure 3, partie inférieure). Les légères différences dans les positions de bandes avec la réaction modèle peuvent être attribuées à des différences d'environnement protéique de FHN-*P* par rapport au système modèle. L'évolution des spectres de différences d'absorbance coïncide avec deux mécanismes d'ordre 1 distincts. La phase de cinétique rapide se manifeste par un changement d'absorbance plus important et un comportement saturant à concentration élevée d'inhibiteur, corrélée à une perte totale d'activité de l'enzyme. Une phase de cinétique lente est également observée lorsque les analyses sont menées à des concentrations saturantes d'hexitol-*P*₂ (10 mM). Cette phase de cinétique lente, qui correspond à

une constante trente fois plus faible et qui contribue à un quart de la variation finale d'absorbance n'est pas liée à l'inhibition observée. A ces concentrations saturantes, les coefficients d'absorption molaire relatifs au FHN-*P* lié sont calculés en supposant que les quatre sites actifs des aldolases sont occupés :

5 $\Delta\epsilon_{431} = 3600 \pm 200 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\Delta\epsilon_{376} = -2140 \pm 110 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\Delta\epsilon_{293} = 12480 \pm 650 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et $\Delta\epsilon_{268} = 5080 \pm 250 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

La stoechiométrie de la liaison de FHN-*P* à l'aldolase pour une inhibition maximale est cohérente avec les absorbances moléculaires différentielles provenant du complexe acide aminocaproïque-FHN-*P*, qui prédit

10 au complexe EI* ayant 3,9-4,2 moles de FHN-*P* liés par mole d'aldolase tétramérique.

Les paramètres cinétiques, K_i et k_2 caractérisant la formation du complexe EI* sont déterminés à partir des données exposées à la Figure 4 selon les équations eqn.(1) ou eqn.(3) et conduisant aux valeurs de

15 $K_i = 125 \pm 25 \text{ } \mu\text{M}$, $k_2 = 0,067 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ et $t_{1/2} \sim 6 \text{ min}$.

La constante globale d'inhibition K_i^* calculée à partir de ces derniers résultats correspond à $25 \pm 15 \text{ nM}$.

- Analyse du complexe aldolase-FHN-*P* par spectrométrie de masse électrospray.

20 L'analyse en spectrométrie de masse électrospray d'un complexe aldolase-FHN-*P* a conduit à des masses moléculaires correspondant à : un monomère d'aldolase (39212 Da) ; un complexe binaire entre une sous-unité d'aldolase et le FHN-*P* (39460 Da), sous forme de base de Schiff, et des traces de complexe tertiaire entre une sous-unité d'aldolase et 2 molécules de FHN-*P*

25 (39712 Da) (Figure 5).

- Interaction entre les mutants de l'aldolase RM et FHN-*P*

Les résidus de lysine 107, 146 et 229 sont localisés au niveau des sites actifs de l'aldolase et sont ainsi des candidats pour réaliser l'inactivation via la formation d'une base de Schiff avec le FHN-*P*. Pour identifier

30 quelle lysine est responsable des absorbances différentielles en présence de FHN-*P*, des mutations ponctuelles de ces résidus de lysine ont été réalisées et

nommées : K107M (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank), K146M (Blonski C. et *al.*, 1997, Biochem. J. 323:71-77) et K229M (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank). La comparaison des coordonnées atomiques de K107M, K229M, et de l'enzyme native, montre que ces mutants de structure sont isomorphes par rapport à l'enzyme sauvage (les déviations standard ("rms déviations") des coordonnées atomiques par rapport à l'aldolase natif est de 0,41 Å et 0,48 Å respectivement pour les structures K107M et K229M). La spectroscopie UV/visible de différence (méthode A) a été utilisée pour examiner la formation du complexe enzymatique pour chaque mutation ponctuelle en présence d'une concentration fixe de FHN-*P* (300 µM). L'analyse des données obtenues à 431 nm est reportée au Tableau 3.

Tableau 3

Aldolase	Activité spécifique (unités/mg)	Activité spécifique résiduelle (%)	k_{app} (min ⁻¹)	ΔA relative à 431 nm (%)
Sauvage	12,5	nd (non détecté)	0,045±0,0025 0,0015±0,0003	100 25
K229M	3.10 ⁻⁶	nd	0,040±0,0025 0,0015±0,0003	95 25
K107M	0,7	95	0,0015±0,0005	30
K146M	2.10 ⁻³	nd	0,005±0,0005 0,0015±0,0003	98 25

Les spectres de différence observés pour le mutant K229M sont identiques à ceux observés avec l'aldolase sauvage. L'évolution de la réaction peut être justifiée par deux mécanismes d'ordre 1 distincts. Les paramètres cinétiques et le niveau de complexe EI* formé sont identiques à ceux obtenus avec l'enzyme sauvage, et excluent la Lys-229 comme résidu de lysine directement responsable de la formation de la base de Schiff.

Par comparaison, les spectres de différences du mutant K107M et de FHN-*P* montrent une phase de cinétique lente dont la constante et

l'absorbance maximale sont identiques aux valeurs de la phase lente observée pour l'enzyme sauvage. L'absence de phase rapide ajoutée à l'absence d'inhibition de l'enzyme prouve l'implication de la Lys-107 dans le phénomène d'inhibition réversible dépendante du temps.

- 5 La réaction du mutant K146M avec FHN-P a pour résultat un changement global d'absorbance à l'équilibre, comparable avec ce qui est observé pour l'aldolase sauvage (Tableau 3). La phase de la cinétique associée à l'inhibition enzymatique, bien que correspondant à un mécanisme d'ordre 1, diffère de ce qui est observé dans le cas de l'aldolase sauvage par une formation
- 10 très lente de la base de Schiff. La substitution de la Lys-147 par une méthionine engendre donc une baisse significative du taux de complexes EI* formés, mais ne change pas la capacité du mutant à former le complexe. Ainsi, la Lys-146 n'est pas requise pour la formation de la base de Schiff mais facilite considérablement celle-ci.

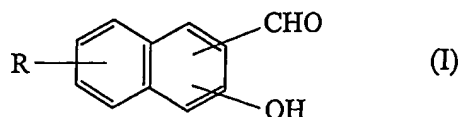
15

REVENDICATIONS

1/ - Composé aromatique comprenant un groupement aldéhyde, un groupement phénol et un groupement phosphate ou un mimétique, caractérisé :

5 - en ce que son noyau aromatique comprend deux maillons aromatiques de type benzénique,

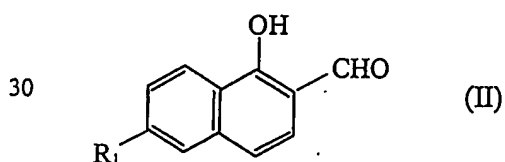
- et en ce qu'il répond à la formule générale suivante :



dans laquelle :

- le groupement aldéhyde (-CHO) et le groupement phénol (-OH) sont fixés à deux atomes de carbone adjacents d'un même maillon aromatique, dit premier maillon aromatique,
- 15 • et fixé à un atome de carbone d'un deuxième maillon aromatique dit second maillon aromatique, R est un groupement phosphate ou un mimétique du groupement phosphate choisi parmi :
 - un groupement protecteur enzymolabile adapté pour permettre audit composé aromatique un passage passif à travers des systèmes membranaires cellulaires et/ou parasitaires et pour pouvoir générer, une fois à l'intérieur d'une cellule ou d'un parasite, la formation d'un groupement phosphate ou d'un analogue stable du groupement phosphate,
 - 20 - un analogue stable du groupement phosphate adapté pour préserver le composé aromatique d'une déphosphorylation spontanée et/ou enzymatique.

2/ - Composé aromatique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il a pour formule générale :



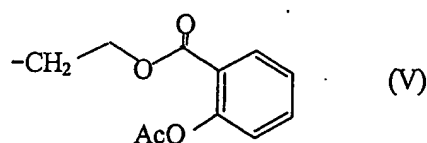
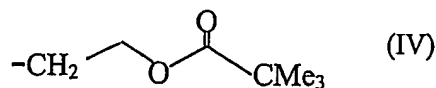
où R_1 est un groupement phosphate ou un mimétique du groupement phosphate.

3/ - Composé aromatique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le groupement protecteur enzymolabile est un groupement de nature à être déprotégé par une(des) estérase(s) et intracellulaires.

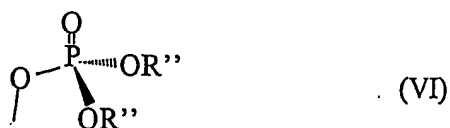
5 4/ - Composé aromatique selon la revendication 3, caractérisé en ce que le groupement protecteur enzymolabile présente la formule générale suivante :



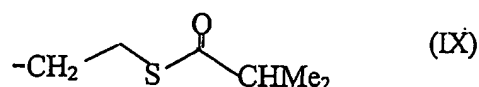
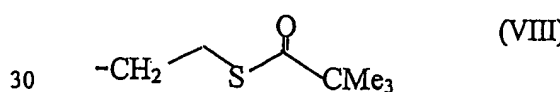
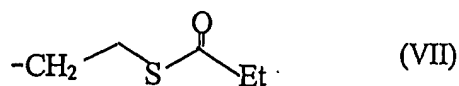
où R' est choisi parmi un des groupements suivants :

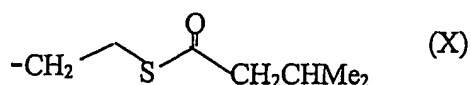


5/ - Composé aromatique selon la revendication 3, caractérisé en ce que le groupement protecteur enzymolabile présente la formule générale suivante :



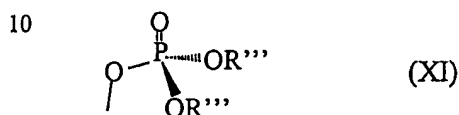
25 où R'' est choisi parmi un des groupements suivants :



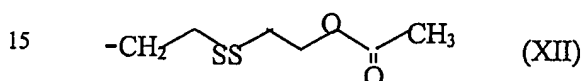


6/ - Composé aromatique selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le groupement protecteur enzymolabile est un groupement de nature à être déprotégé par une(des) réductase(s) intracellulaire(s).

7/ - Composé aromatique selon la revendication 6, caractérisé en ce que le groupement protecteur enzymolabile présente la formule générale suivante :



où R''' est choisi parmi un des groupements suivants :



8/ - Composé aromatique selon la revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'analogue stable du phosphate est choisi parmi l'un des groupements suivants :

- le méthylènegphosphonate,
- le difluorométhylènegphosphonate,
- le monofluorométhylènegphosphonate.

9/ - Composé aromatique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'un atome d'hydrogène d'au moins un des atomes de carbone d'au moins un des maillons aromatiques est substitué par un substituant, dit substituant hydrophobe, adapté pour améliorer l'hydrophobicité globale du composé aromatique.

10/ - Composé aromatique selon la revendication 9, caractérisé en ce que le(les) substituant(s) hydrophobe(s) est(sont) un(des) groupement(s) alkyle(s) de chaîne principale comprenant au maximum trois atomes de carbone.

11/ - Composé aromatique selon l'une des revendications 1 à 10, pour ses utilisations non-thérapeutiques comme agent inhibiteur de l'activité des aldolases de classe I.

12/ - Composé aromatique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il présente une constante d'inhibition K_i inférieure à 25 μM , notamment inférieure à 50 nM, typiquement de l'ordre de 25 nM.

13/ - Composé aromatique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'inhiber au moins une aldolase de façon irréversible ou quasi irréversible.

14/ - Procédé d'inhibition d'aldolases extracellulaires ou intracellulaires, à l'exception des aldolases intracellulaires de cellules vivantes non isolées d'un corps humain ou animal, ou d'un embryon humain, caractérisé en ce qu'on met lesdites aldolases au contact d'au moins un composé aromatique selon l'une des revendications 1 à 13, au moins en quantité suffisante pour induire un effet notable.

15/ - Procédé selon la revendication 14, appliqué à l'inhibition de la glycolyse cellulaire.

16/ - Procédé selon la revendication 14 ou 15, appliqué pour enrayer le développement d'une cellule cancéreuse.

17/ - Médicament comprenant un composé aromatique selon l'une des revendications 1 à 13.

18/ - Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 13, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement du cancer.

19/ - Utilisation selon la revendication 18, pour la fabrication d'un médicament pour le traitement du cancer s'effectuant selon l'approche GRH.

20/ - Procédé de synthèse d'un composé 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde phosphorylé sur un atome de carbone du deuxième maillon aromatique, selon la revendication 1, dans lequel on réalise une étape de phosphorylation d'un composé 2-naphtaldéhyde dihydroxylé, hydroxylé sur

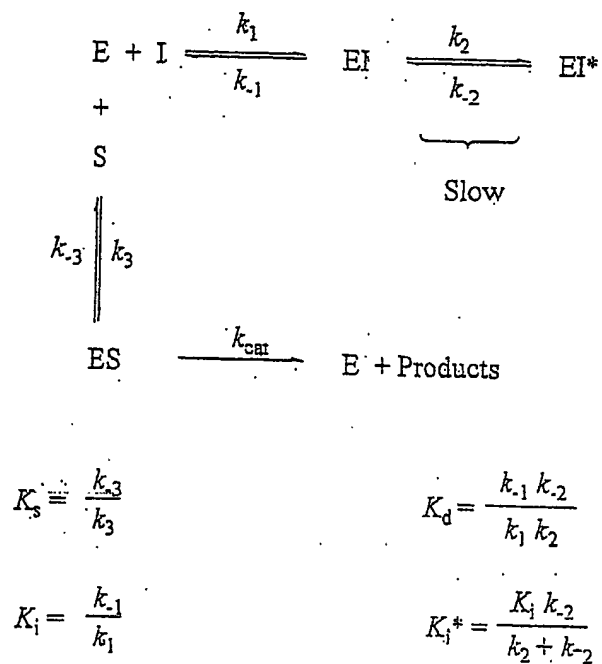
l'atome de carbone 1 du premier maillon aromatique et sur un des atomes de carbone du second maillon aromatique, ladite phosphorylation correspondant à une substitution du groupement hydroxyle du second maillon aromatique par un groupement phosphate.

21/ - Procédé de synthèse selon la revendication 20, caractérisé en ce que la phosphorylation est initiée par la technique du triéthyl phosphite, pyridine et iode, dans une solution de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$.

22/ - Procédé de synthèse selon la revendication 20 ou 21,
caractérisé en ce que la phosphorylation se réalise sur le 1,6-dihydroxy-2-
10 naphthaldéhyde pour conduire au 5-formyl-6-hydroxy-2-naphtylphosphate.

1/3

FIGURE 1



Scheme 1

$$k_{\text{app}} = k_2 + \left[k_2 \frac{[\text{I}]/K_i}{1 + [\text{I}]/K_i} \right] \quad \text{eqn. (1)}$$

$$[\text{EI}^*] = \frac{([\text{E}]_t + [\text{I}]_t + K_d) - \sqrt{([\text{E}]_t + [\text{I}]_t + K_d)^2 - 4([\text{E}]_t [\text{I}]_t)}}{2} \quad \text{eqn. (2)}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} \left[1 + \frac{K_i}{[\text{I}]} \right] \quad \text{eqn. (3)}$$

2/3

Figure 2

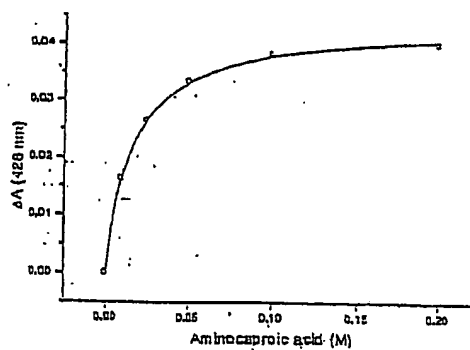
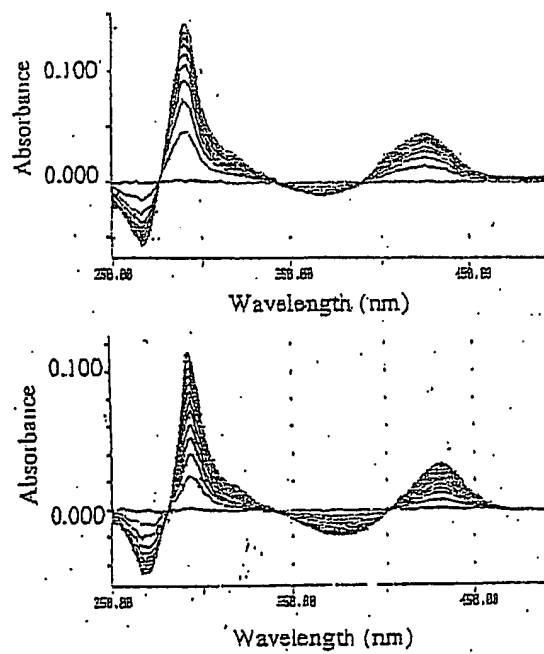
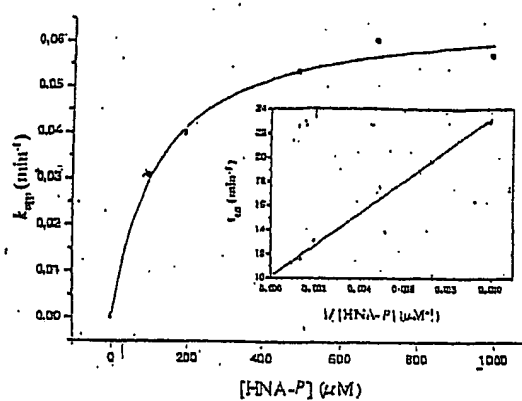


Figure 3

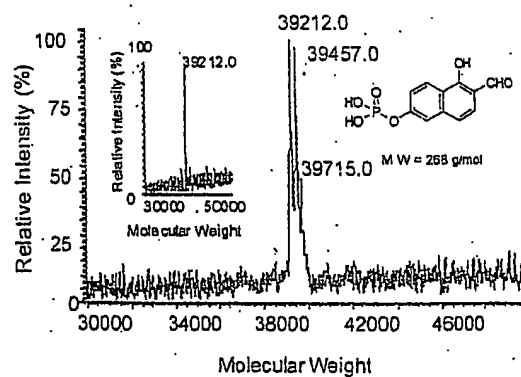


3/3

Figure 4



e 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
T/FR2004/001664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07F9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLONSKI C, ET AL.: "Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds" BIOCHEM. J., vol. 323, 1997, pages 71-77, XP002266231 cited in the application scheme 2 abstract	
A	GEFFLAUT T, ET AL.: "Class I Aldolases" PROG. BIOPHYS. MOLEC. BIOL., vol. 63, no. 3, 1995, pages 301-340, XP002266232 cited in the application page 322	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2004

Date of mailing of the international search report

21/01/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seelmann, I

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mande internationale No

CT/FR2004/001664

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07F9/12

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BLONSKI C, ET AL.: "Inhibition of rabbit muscle aldolase by phosphorylated aromatic compounds" BIOCHEM. J., vol. 323, 1997, pages 71-77, XP002266231 cité dans la demande scheme 2 abrégé	
A	GEFFLAUT T, ET AL.: "Class I Aldolases" PROG. BIOPHYS. MOLEC. BIOL., vol. 63, no. 3, 1995, pages 301-340, XP002266232 cité dans la demande page 322	1-22

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 novembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/01/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Seelmann, I

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.